

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**AZ ADENOZIN RECEPTOROK SZEREPE A MIKROGLIÁK ÉS
MAKROFÁGOK KLASSZIKUS ÉS ALTERNATÍV AKTIVÁCIÓJÁNAK
SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Koscsó Balázs

Témavezető: Dr. Haskó György, M.D., Ph.D.



EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

IMMUNOLÓGIA PROGRAM

PROGRAMVEZETŐ: ERDEI ANNA DSC., MTA LEV. TAG, EGYETEMI TANÁR

BUDAPEST, 2012

1.Bevezetés

Mikroglia, az agy mononukleáris fagocitája

A mononukleáris fagocita rendszer sejtjei központi szerepet töltenek be a patogének elleni immunválaszban mind az agyban mind a perifériás szervekben. A központi idegrendszer fő mononukleáris fagocita sejtjei, a mikroglia három különböző alakban található meg, úgymint ramifikált, aktivált és amöboid. A mikroglia patogénhez asszociált molekuláris mintázatok illetve endogén veszélyt jelző molekulák felismerése esetén aktiválódnak. A patogén felismerő receptorok egyik legfontosabb családja a Toll-szerű receptorok (TLR) családja, amelynek tagjai megtalálhatóak a mikroglia felszínén. A peptidoglikán (PGN) és lipopoliszacharid (LPS) a baktériumok sejtfalának komponensei, amelyeket a mikroglia TLR2 illetve TLR4 receptorai ismernek és aktivált profil kialakulását idézik elő. Az aktivált mikroglia gyulladások citokinek termelnek, például tumor nekrozis faktor (TNF)- α , interleukin (IL)-6 és IL-12, amelyek homeosztatikus, élettani funkcióik mellett fontos szerepet töltenek be az idegrendszer gyulladásos folyamataiban is.

Mivel az idegrendszer túlzott mértékű illetve krónikus gyulladásos folyamatai jelentős mértékben hozzájárulnak az agy számos megbetegedése során tapasztalható idegi károsodáshoz, valamint az idegsejtek korlátozott regeneratív képessége miatt, a gyulladásos folyamatok szoros szabályozása a központi idegrendszerben kulcsfontosságú. Az egyik legfontosabb szabályozó komponens a gyulladáscsökkentő citokin IL-10, amelyet mikroglia, valamint asztrocita és beszűrődő T sejtek szekretálnak az agyban. Az IL-10 a központi idegrendszer számos rendellenessége során tölt be idegsejteket védő funkciót, például szklerózis multiplex, traumás agy sérülés valamint Parkinson-kór.

A makrofágok alternatív aktivációja

A patogénhez asszociált molekulák mellett különböző citokinek is képesek aktiválni a makrofágokat. Az 1-es típusú T-helper sejtekre (T_H1) jellemző citokin, az interferon (IFN)- γ hatására gyulladásos fenotípusú makrofágok alakulnak ki. Ezt a populációt klasszikusan aktivált, vagy M1 makrofágoknak nevezik. A klasszikusan aktivált makrofágok reaktív nitrogén illetve oxigén intermediereket (nitrogén-monoxid, peroxinitrit, hidrogén-peroxid, szuperoxid-anion) és gyulladásos citokinek (TNF- α , IL-6, IL-12) termelnek és a mikrobiális fertőzések elleni védekezésben vesznek részt. Ezzel szemben az alternatív aktiváció T_H2 típusú citokinek jelenlétében történik, például parazita fertőzések illetve

sebggyógyulás esetében, és gyulladáscsökkentő valamint immunszabályozó tulajdonságok kifejeződését idézi elő a makrofágoknál (M2 makrofágok). A legfontosabb, alternatív aktiváció előidézésére képes T_H2 típusú citokinek az IL-4 és IL-13. A két citokin részben átfedő gén mintázat kifejeződését idézi elő makrofágokban többek között a STAT-6 és C/EBP β transzkripció faktorok aktiválásával. Az egyik legjellemzőbb IL-4 és IL-13 hatására kifejeződő gén az *argináz-1*. Az alternatívan aktivált makrofágok által termelt argináz-1 az extracelluláris mátrix átrendeződésének elősegítésével a sebggyógyulási folyamatokban játszik fontos szerepet, emellett az IFN által indukált nitrogén-monoxid termelést is szabályozza. További IL-4 illetve IL-13 hatására kifejeződő alternatív aktivációs markereknek tekintett feherjék a mátrix metalloproteináz szöveti inhibitor-1 (TIMP-1), amely az extracelluláris mátrix lebontását szabályozza, illetve a makrofág galaktóz-típusú C-típusú lektin (mgl-1), amely a parazita férgek valamint tumorsejtek glikoproteinjeit felismerő receptor.

Adenozin, mint extracelluláris jelátvivő molekula

Az adenozin egy purin nukleozid, amely nélkülözhetetlen komponense az intracelluláris metabolikus folyamatoknak, és a nukleinsavak illetve adenozin-trifoszfát prekursorául is szolgál. Metabolikus stressz, fizikai sérülés, gyulladás illetve apoptózis során az adenozin az extracelluláris térbe kerülve széleskörű, minden szövetet illetve szervet érintő szabályozó funkciókat lát el. Az adenozin sejtekre gyakorolt hatásait a G proteinhez kötődő adenozin receptorok (AR) közvetítik. Négy AR altípus ismert, az A_1 , A_{2A} , A_{2B} és A_3 AR. A G_i proteinhez kötött A_1 AR és A_3 AR az adenilil cikláz enzim gátlásával csökkentik az intracelluláris ciklikus adenozin-monofoszfát koncentrációt (cAMP), míg az A_{2A} AR és A_{2B} AR G_s proteinhez asszociáltak és növelik a cAMP koncentrációt.

Az adenozin az immunrendszer számos sejtípusára fejt ki főleg gyulladáscsökkentő hatást, például a mononukleáris fagociták, limfociták valamint hízósejtek működését befolyásolja. Az adenozin szabályozza a mikroglia proliferációját, migrációját, valamint a gyulladáskeltő mediátorok és neurotróp faktorok felszabadulását. Az adenozin szintén gátolja a klasszikus módon aktivált makrofágok gyulladáskeltő citokin termelését, ugyanakkor elősegíti a gyulladáscsökkentő IL-10 termelését.

2. Célkitűzések

Bár az utóbbi évtizedek során az adenzin mononukleáris fagocitákra kifejtett hatásairól rendelkezésre álló ismeretek mennyisége drámaian megnövekedett, még számos tisztázatlan pont van az adenzin szabályozó funkcióival kapcsolatban. Ilyen például, az adenzinnak a mikroglia IL-10 termelésére kifejtett hatása, amelyet a már leírt gyulladásoktó citokineket szabályozó funkciókkal ellentétben, még nem vizsgáltak. Emellett, az adenzin hatásait korábban csak klasszikus módon aktivált makrofágokban vizsgálták, míg az alternatív aktivációt szabályozó funkciók eddig feltáratlanok. Munkánk során a hiányos ismeretek pótlása érdekében a következő célkitűzéseket állítottuk fel:

1. Meghatározni az adenzinnak a TLR ligandumok által aktivált mikroglia IL-10 termelésére kifejtett hatásait. Összehasonlítani ezeket a hatásokat az adenzin IL-6, IL-12, illetve TNF- α termelést szabályozó funkcióival.
2. Azonosítani az adenzinnak a mikroglia IL-10 termelésére kifejtett hatásait közvetítő AR altípust.
3. Megvizsgálni az adenzinnak a mikroglia IL-10 termelésére kifejtett hatásaiban szerepet játszó intracelluláris jelátviteli utakat.
4. Meghatározni az adenzin hatásait a makrofágok IL-4 és IL-13 által indukált alternatív aktivációjára
5. Azonosítani az adenzin alternatív aktivációra gyakorolt hatásaiért felelős AR altípusokat
6. Megvizsgálni az intracelluláris jelátviteli utakat amelyek szerepet játszanak adenzinnak az alternatív aktivációra kifejtett hatásaiban.

3. Módszerek

Felhasznált primer sejtek és sejtvonalak

Kísérleteinkhez 1-3 napos C57Bl/6J egerek agykérgéből izolált primer mikrogliaikat illetve tioglikoláttal beoltott egerek hasüregéből kimosott peritoneális makrofágokat, valamint BV-2 egér mikroglia sejtvonalat, RAW 264.7 egér makrofágokat, C/EBP β KO és WT immortalizált makrofágokat használtunk.

Citokin koncentraciók meghatározása ELISA segítségével

IL-10, IL-6, IL-12, TNF- α és TIMP-1 koncentrációkat primer mikrogliaik és makrofágok, illetve BV-2 és RAW 264.7 sejtek felülszójából határoztuk meg ELISA DuoSet kitek segítségével 24 órával a különböző kezelések után.

RNS izolálás, cDNS szintézis és valós idejű PCR

Peritoneális makrofágokból, BV-2 és RAW 264.7 sejtekből Trizol reagens, míg primer mikrogliaikból RNeasy Mini kit segítségével izoláltunk RNS-t. Az RNS mintákból reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk, majd valós idejű PCR segítségével meghatároztuk az IL-10, különböző AR, argináz-1, TIMP-1 valamint mgl-1 expresszió mértékét a konstitutív riboszomális RNS 18S mennyiségére vonatkoztatva.

Tranziens transzfekció

A BV-2 és RAW 264.7 sejtek transzfekciójához Polyfect, illetve FUGENE transzfekciós reagenseket használtunk. A BV-2 sejteket IL-10 promóter és CREB riporter plazmidokkal, míg a RAW 264.7 makrofágokat argináz-1 promóter és C/EBP β riporter plazmidokkal transzfektáltuk. A kezelések után sejtizámukból határoztuk meg a luciferáz aktivitásokat.

Fehérje kivonás és Western blot

Western blot kísérleteinkhez BV-2 sejtek illetve peritoneális és RAW 264.7 makrofágok teljes fehérje tartalmát RIPA pufferben történő homogenizálás segítségével vontuk ki. A fehérje mintákat 10%-os Tris-Glicin gélen történt elválasztás után nitrocellulóz membránra transzferáltuk, amit különböző nyúlban termeltetett IgG típusú ellenanyagokkal

valamint másodlagos, HRP-vel konjugált ellenanyagokkal inkubáltunk. A sávok detektálása ECL Western blot detekciós reagenssel történt.

RNS interferencia

BV-2 vagy RAW 264.7 sejteket CREB specifikus vagy kontrol shRNS-t tartalmazó lentivirális partikulumokkal transzdukáltunk. Az shRNS-t stabilan kifejező sejteket puromycin rezisztencia alapján szelektáltuk. A géncsendesítés hatékonyságát CREB specifikus ellenanyagok segítségével ellenőriztük Western blot módszerrel.

Kromatin immunprecipitáció

Az immunprecipitációt foszfo-CREB specifikus ellenanyagokkal végeztük, majd az izolált DNS-t PCR segítségével vizsgáltuk az IL-10 promóterre specifikus primerek felhasználásával.

Argináz aktivitás mérése

Különféle kezelések után peritoneális makrofágokat, RAW 264.7 sejteket valamint C/EBP β KO és WT immortalizált makrofágokat 10 mM Tris-HCl-t (pH 7.4) és 0.4% Triton X-100-at tartalmazó pufferben homogenizáltunk, majd a sejtizátumokból egy kereskedelmi forgalomban kapható kit segítségével határoztuk meg az argináz aktivitást.

4. Eredmények

Az adenosin növeli az aktivált mikroglia IL-10 termelését, ellenben az IL-6, TNF- α és IL-12 termelést gátolja

Eredményeink alapján a PGN kezelés IL-10, IL-6 és TNF- α termelést vált ki primer mikrogliaokban. Az adenosin kezelés tovább növelte a PGN által indukált IL-10 termelést, ugyanakkor gátolta az IL-6 és TNF- α szekréciót. Az adenosin szintén emelte a PGN vagy LPS kezelést kapott BV-2 sejtek IL-10 termelését és gátolta az IL-6, TNF- α és IL-12 termelést.

Az adenozin az A_{2B}AR-ot stimulálva növeli a mikroglia IL-10 termelését

Az adenozinak mikroglia IL-10 termelésre kifejtett hatásáért felelős AR azonosítása érdekében különböző AR agonistákat illetve antagonistákat használtunk. Az agonisták közül a nem szelektív NECA növelte a leghatásosabban a BV-2 sejtek IL-10 termelését mind PGN, mind LPS kezelés esetében. Az A₁AR, A_{2A}AR illetve A₃AR specifikus szelektív agonisták nem vagy csak kisebb mértékben növelték az IL-10 kifejeződést, ami az A_{2B}AR szerepére utal. A szelektív antagonistákkal végzett kísérleteink megerősítették ezt az eredményt, mivel egyedül az A_{2B}AR specifikus antagonista, MRS1754 volt képes meggátolni a NECA kezelés IL-10 termelést növelő hatását. Ezt követően a PGN illetve LPS kezelésnek a négy AR mRNS kifejeződésére gyakorolt hatását vizsgáltuk BV-2 sejtekben és primer mikrogliaiban. Eredményeink azt mutatták, hogy az A_{2B}AR és az A₃AR mRNS mennyisége volt a legnagyobb kezeletlen BV-2 sejtekben. Primer mikrogliaiban szintén az A_{2B}AR volt a legnagyobb mértékben kifejeződő AR. Az A_{2B}AR mRNS mennyiségét mind a PGN, mind az LPS kezelés növelte mikrogliaiban.

Az AR stimuláció növeli az IL-10 mRNS mennyiségét a CREB transzkripció faktor részvételével

További kísérleteink során azt találtuk, hogy a NECA kezelés növelte az IL-10 mRNS mennyiségét PGN-nel aktivált BV-2 sejtekben. A transzkripciót gátló Actinomycin D kivédte a NECA hatását. Az AR stimuláció IL-10 transzkripcióra gyakorolt hatásainak további vizsgálatához olyan plazmid konstrukttal transzfektáltunk BV-2 sejteket, amelyekben a luciferáz fehérje kifejeződése az IL-10 promóter különböző deléciós mutánsainak függvénye volt. Eredményeink azt mutatták, hogy a start helytől számított -376 bp és -158 bp közötti régió jelenléte szükséges a NECA IL-10 promóter aktivitását növelő hatásához. Mivel az említett régióban megtalálható egy CREB kötőhely, a következőkben CREB kötőhelyeket tartalmazó luciferáz konstrukttal (pCRE) transzfektáltunk BV-2 sejteket. A NECA kezelés növelte a luciferáz aktivitást a transzfektált sejtekben, bizonyítva az AR stimuláció CREB aktiváló képességét. ChIP illetve RNS interferencia módszerek segítségével megerősítettük, hogy a NECA kezelés CREB aktiváción keresztül növeli az IL-10 termelést PGN-nel aktivált BV-2 sejtekben. Ezen kívül két intracelluláris kináz, a p38 illetve PI3K szerepét is kimutattuk a folyamatban, Western blot illetve farmakológiai módszerekkel.

Az adenosin kezelés növeli az IL-4 illetve IL-13 által indukált alternatív aktivációt makrofágokban egy TLR-től független mechanizmussal

A következőkben az adenosin különböző alternatív aktivációs markerek kifejeződésére gyakorolt hatásait vizsgáltuk. Eredményeink alapján az adenosin illetve a NECA megnövelte az IL-4 vagy IL-13 által indukált argináz aktivitást és expressziót, valamint a TIMP-1 mRNS és protein mennyiségeket makrofágokban. Az IL-4 önmagában illetve az adenosin és IL-4 együtt TLR4 deficiens egerekből izolált makrofágoknál is növelte a TIMP-1 termelést, ami azt mutatja, hogy nem TLR-4 függő a folyamat. Az argináz és TIMP-1 mellett az mgl-1 mRNS mennyiségét is növelte az adenosin alternatíván aktivált makrofágokban.

Az A_{2A}AR és A_{2B}AR szerepe az adenosin alternatív aktivációra kifejtett hatásaiban

Kísérleteink során kimutattuk, hogy az AR agonisták közül a NECA volt a leghatásosabb az IL-4 által indukált argináz és TIMP-1 expresszió növelésében, ami az A_{2B}AR szerepére utal. Ezt megerősítették további kísérleteink, melyek során azt tapasztaltuk, hogy A_{2B}AR deficiens egerekből származó makrofágoknál a NECA kezelés nem képes növelni a TIMP-1 expressziót, valamint az A_{2B}AR farmakológiai gátlása szintén megakadályozta a NECA argináz aktivitást illetve TIMP-1 termelést megnövelő hatását. Az adenosin illetve NECA növelte ugyan az IL-4 által indukált TIMP-1 termelést A_{2A}AR KO makrofágokban, de a vad-típusú makrofágoknál kisebb hatékonysággal, ami azt mutatja, hogy az A_{2A}AR is játszhat kiegészítő szerepet az adenosin alternatív aktivációra kifejtett hatásaiban.

Az adenosinnak az IL-4 által indukált argináz expresszióra kifejtett hatása C/EBP β függő

A továbbiakban egy argináz promóter-luciferáz konstrukt felhasználásával kimutattuk, hogy mind az adenosin, mind a NECA növeli az IL-4 által indukált argináz promóter aktivitást makrofágokban. Ezek után a C/EBP β , a CREB és a STAT-6 transzkripciós faktorok szerepét vizsgáltuk, amelyek részvételét az alternatív aktivációban korábban már leírták. C/EBP β riporter plazmiddal végzett kísérleteink eredménye szerint az együttes adenosin és IL-4 kezelés megnöveli a C/EBP β transzkripciós aktivitását makrofágokban. Ezt követően C/EBP β KO és vad-típusú immortalizált makrofágokon

vizsgáltuk az adenosin és IL-4 argináz aktivitásra kifejtett hatását. Az IL-4 kezelés növelte az argináz aktivitást KO és vad-típusú sejtekben, az adenosin viszont csak a vad-típusú makrofágokban volt képes tovább növelni az argináz aktivitást, ami azt mutatja, hogy a C/EBP β szükséges az adenosin hatásához. Ezzel ellentétben, eredményeink alapján a CREB nem vesz részt a folyamatban, mivel az adenosin argináz aktivitást növelő hatását nem befolyásolta a CREB shRNS-sel történő lecsendesítése RAW 264.7 sejtekben. Emellett a STAT-6 szerepét is kizártuk, mivel az IL-4 által indukált STAT-6 foszforilációt nem növelte meg az adenosin kezelés, hanem lecsökkentette.

A következőkben az intracelluláris kinázok szerepét tanulmányoztuk az adenosin alternatív aktivációra kifejtett hatásaiban. Western blot kísérleteink azt mutatták, hogy a vizsgált kinázok közül a p38 játszik szerepet, mivel az adenosin egymagában illetve az adenosin és IL-4 együtt p38 foszforilációt indukált makrofágokban. A p38 aktiváció farmakológiai gátlása megakadályozta az adenosin argináz aktivitást illetve TIMP-1 termelést növelő hatását, megerősítve ezzel a p38 szerepét az adenosin alternatív aktivációra kifejtett hatásaiban.

5. Összefoglalás

Munkánk során kimutattuk, hogy az A_{2B}AR mind a klasszikus módon aktivált mikrogliák, mind az alternatívan aktivált makrofágok működését szabályozza. TLR ligandumok által aktivált mikrogliákban az A_{2B}AR növeli az IL-10 felszabadulást egy a CREB-től függő transzkripció mechanizmus segítségével. Az A_{2B}AR stimuláció szintén növeli az argináz kifejeződést és aktivációt alternatívan aktivált makrofágokban, valamint az A_{2A}AR kisebb mértékű hozzájárulásával az IL-4 által indukált TIMP-1 temelést. Az AR stimuláció alternatív aktivációt befolyásoló hatásai a C/EBP β transzkripció faktor részvételével zajlanak makrofágokban.

Mivel az A_{2B}AR különböző aktivációs profillal rendelkező makrofág populációk működését képes szabályozni, ez a receptor terápiás célpont lehet a központi idegrendszer gyulladásos és neurodegeneratív megbetegedései esetében, valamint olyan betegségeknél is amelyek abnormális T_H2 immunválasszal illetve hibásan működő altenatív makrofág aktivációval járnak.

6. Publikációs jegyzék

Az értekezés az alábbi közlemények alapján íródott:

Koscsó B, Csóka B, Selmeczy Z, Himer L, Pacher P, Virág L and Haskó G: Adenosine augments IL-10 production by microglial cells through an A2B adenosine receptor-mediated process. *Journal of Immunol.* 2012 Jan 1;188(1):445-53. **IF: 5.745**

Csóka B, Selmeczy Z, **Koscsó B**, Németh ZH, Pacher P, Murray PJ, Kepka-Lenhart D, Morris SM Jr, Gause WC, Leibovich SJ and Haskó G: Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B adenosine receptors. *FASEB Journal.* 2012 Jan; 26(1):376-86. **IF: 6.515**

Egyéb közlemények:

Csóka B, Németh ZH, Selmeczy Zs, **Koscsó B**, Pacher P, Vizi ES, Deitch EA and Haskó G: Role of A_{2A} adenosine receptors in regulation of opsonized *E. coli* induced macrophage function. *Purinergic Signalling.* 2007. 3(4):447-452.

Himer L, Csóka B, Selmeczy Z, **Koscsó B**, Pócza T, Pacher P, Németh ZH, Deitch EA, Vizi ES, Cronstein BN, Haskó G: Adenosine A2A receptor activation protects CD4⁺ T lymphocytes against activation-induced cell death. *FASEB Journal.* 2010 Aug;24(8):2631-40. **IF: 6.515**

Csóka B, Németh ZH, Rosenberger P, Eltzschig HK, Spolarics Z, Pacher P, Selmeczy Z, **Koscsó B**, Himer L, Vizi ES, Blackburn MR, Deitch EA, Haskó G: A2B adenosine receptors protect against sepsis-induced mortality by dampening excessive inflammation. *Journal of Immunology.* 2010 Jul 1;185(1):542-50. **IF: 5.745**

Koscsó B, Csóka B, Pacher P and Haskó G: Investigational A₃ adenosine receptor targeting agents. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2011 Jun; 20(6):757-68. **IF: 4.337**

Haskó G, Csóka B, **Koscsó B**, Chandra R, Pacher P, Thompson LF, Deitch EA, Spolarics Z, Virág L, Gergely P, Rolandelli RH and Németh ZH: Ecto-5'-nucleotidase (CD73) decreases mortality and organ injury in sepsis. *Journal of Immunology.* 2011 Oct 15;187(8):4256-67. **IF: 5.745**